

4
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 14 FEB 2000

WIPO

PCT

EPO - Munich
31

28. Jan. 2000

EPO 00 / 142

Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Bindungspartner für 5-HT₅-Rezeptoren zur Migränebehandlung"

am 11. Januar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 61 K, C 12 N und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 19. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Jerofsky

Aktenzeichen: 199 00 674.1

BASF Aktiengesellschaft 981006 04/98/49689

Bindungspartner für 5-HT5-Rezeptoren zur Migränebehandlung

Die vorliegende Erfindung betrifft Bindungspartner für 5-HT5-Rezeptoren, Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung solcher Bindungspartner, sowie diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzungen und deren Verwendung zur Behandlung cerebrovaskulärer Erkrankungen wie Migräne.

- 10 Wenigstens sieben verschiedene Rezeptorklassen vermitteln die mannigfaltigen physiologischen Aktivitäten, die einer Beteiligung des Neurotransmitters Serotonin (5-Hydroxytryptamin, kurz 5-HT) zugeschrieben werden. Sie werden entsprechend einer international anerkannten Klassifikation mit 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 15 5-HT6 und 5-HT7 bezeichnet. Die meisten dieser Klassen umfassen darüber hinaus weitere unterscheidbare Rezeptortypen. So gehören zur 5-HT1-Klasse Rezeptoren, welche sich in wenigstens fünf Unterklassen einteilen lassen, die mit 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1C, 5-HT1D und 5-HT1E bezeichnet werden (Boess F.G. und Martin I.L., 20 Neuropharmacology 33:275-317 (1994)).

- Die 5-HT5-Klasse wurde erstmals beschrieben von Plassat et al., The EMBO Journal Bd. 11 Nr. 13, S. 4779-4786 (1992). Man unterscheidet 5-HT5A- und 5-HT5B-Rezeptoren (Erlander et al., Proc. 25 Natl. Acad. Sci. USA 90:3452-3456 (1993)). Es bestehen nur geringe Sequenzhomologien zwischen 5-HT5 und anderen 5-HT-Rezeptoren. Das pharmakologische Profil dieser Rezeptoren unterscheidet sich deutlich. Mit molekularbiologischen Techniken gelang die Lokalisierung von 5-HT5-Rezeptoren im Riechkolben, im Hippocampus, 30 im Cortex, in den Zerebralventrikeln, im Corpus Callosum und im Kleinhirn. Mittels immunhistochemischer Methoden konnte gezeigt werden, daß 5-HT5-Rezeptoren vornehmlich auf Astrocyten exprimiert werden (Carson et al., GLIA 17:317-326 (1996)). Astrocyten liegen direkt an der Basalmembran von Gehirnkapillaren der Bluthirnschranke an. Eine anormale Astrocyten-Endothelium-Struktur 35 geht mit einem Verlust der Bluthirnschranke einher. Die genaue Bedeutung der Astrocyten ist unklar. Sie scheinen Transportaufgaben und konnektive Funktionen wahrzunehmen. Reaktive Astrocyten wurden in Zusammenhang mit reaktiver Gliosis bei einer Reihe von 40 pathologischen Gehirnveränderungen und neuropsychiatrischen Erkrankungen beobachtet. Infolge von Gehirnverletzungen verändern sie ihre Morphologie. Das Proteinexpressionsmuster ändert sich und Wachstumsfaktoren werden produziert. In vitro-Untersuchungen an kultivierten Astrocyten haben 5-HT5-Rezeptor-vermittelte Ant- 45 worten erkennen lassen. So wird einerseits vermutet, daß sie an Erholungsprozessen des Gehirns nach Störungen beteiligt sind, an-

2

dererseits ist aber auch nicht auszuschließen, daß sie zur Schadensentstehung oder sogar zu einer Schadensvermehrung beitragen.

Migräne ist eine ZNS-Erkrankung, die große Bevölkerungsteile be-
5 trifft. Sie äußert sich in den meisten Fällen durch immer wieder-
kehrende Kopfschmerzen, von denen schätzungsweise 8 Mio Personen,
d.h. 3-5 % aller Kinder, 7% aller Männer und 14% aller Frauen,
betroffen sind. Wenngleich eine genetische Prädisposition propa-
giert wird, scheinen die Ursachen doch vielschichtig zu sein
10 (Diener H.C. et al., Arzneimitteltherapie 15:387-394 (1997)).

Es dominieren zwei Hypothesen. Die schon seit langem bekannte Ge-
fäß-Theorie schlägt als Ursache einen Dilatationsvorgang des in-
neren und äußeren zerebralen Gefäßsystems vor. Die neurogene
15 Theorie stützt sich auf eine Ausschüttung vasoaktiver Neurotrans-
mitter, vornehmlich Neuropeptide, wie Substanz P and Neurokinin,
aus Axonen der Vaskulatur infolge einer Stimulierung bestimmter
Gehirngewebe innervierender Ganglien, was zu entzündlichen Reak-
tionen und somit zu Schmerz führen soll.

20 Eine Kausaltherapie zur Behandlung von Migräne gibt es derzeit
noch nicht. Zwei verschiedene Behandlungsmethoden kommen momentan
zur Anwendung. Eine erste, prophylaktische, Therapie zur Vorbeu-
gung gegen wiederkehrende Migräneattacken und eine zweite, sym-
25 ptomatische, Therapie zur Unterdrückung akuter Symptome bei At-
tacken. Prophylaktisch werden migränespezifische Wirkstoffe, wie
Sanmigran^R, Nocerton^R, Desernil^R und Vidora^R, aber auch gewöhnlich
für andere Indikation verwendete Wirkstoffe, wie Beta-Blocker,
antiemetische Wirkstoffe wie Sibelium^R, Antidepressiva wie Laro-
30 xyl^R, oder antiepileptische Wirkstoffe wie Depakin^R, verabreicht.
Im Rahmen der Akuttherapie gibt man Analgetika, wie Aspirin^R, Pa-
racetamol oder Optalidon^R, nichtsteriodale Antiinflammatica, wie
Cebutid^R, Voltaren^R, Brufen^R, Ponstyl^R, Profenid^R, Apranx^R und Na-
prosin^R gegen den Schmerz und Entzündungen, Ergotalkaloide, wie
35 Ergotamin, Dihydroergotamin, die eine Vasokonstriktion auslösen
können, oder Substanzen der Triptan-Familie, wie Sumatriptan, Na-
ramig^R, und AscoTop^R mit hoher Affinität für 5-HT_{1D}-Rezeptoren.
Letztere Substanzen wirken als Agonist und blockieren die Vasodi-
latation.

40 Die genannten Wirkstoffe sind allerdings nicht optimal für die
Behandlung von Migräne geeignet. Nichtopioidale Analgetika haben
häufig Nebenwirkungen. Der komplexe Wirkungsmechanismus der Ergo-
talkaloide führt infolge der starken peripheren Vasokonstriktion
45 zu Nebenwirkungen wie Hypertonie and Gangrän. Zu der Triptan-Fa-
milie gehörende Verbindungen sind ebenfalls nicht völlig zufrie-
denstellend (Pfaffenrath V. Münch. med. Wschr. 625-626 (1998)).

Sumatriptan (Imigran^R), einer der effektivsten und am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe gegen akute Migräneattacken, passiert aufgrund ausgeprägter Hydrophilie die Bluthirnschranke nicht. In 28 % der Patienten ist dieser Wirkstoff wirkungslos, die oralen
5 Dosen liegen mit 50-100 mg recht hoch. Als Gegenanzeigen sind koronare Vasospasmen, Hypertonie, Nieren- und Leberstörungen bekannt geworden.

- Bislang hat man Verbindungen mit selektiver Affinität für
- 10 5-HT₁-Rezeptoren zur Behandlung von Migräne in Betracht gezogen (Goadsby P.J. CNS Drugs 10:271-286 (1998); Saxena P.R. Exp. Opin. Invest. Drugs 581-593 (1996)). Beispielsweise gilt Sumatriptan als ausgesprochen selektiver Ligand für 5-HT_{1D}-Rezeptoren, weshalb die Fachwelt bemüht war, diese Bindungseigenschaften und die
15 dadurch vermittelten vasokonstriktiven Aktivitäten zu optimieren. Ähnliches gilt für 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1F}-Rezeptorliganden. So wurden Serien von Wirkstoffen entwickelt, die den geschilderten Problemen allerdings auch nicht abhelfen konnten.
- 20 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, die, vorzugsweise akute, Behandlung migräneartiger cerebrovaskulärer Erkrankungen mit ausreichender Wirksamkeit und geringen Nebenwirkungen zu ermöglichen.

- 25 Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß Substanzen mit vergleichsweise hoher Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren die gewünschten Wirkungen vermitteln können.

- Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher selektive
30 Bindungspartner für 5-HT₅-Rezeptoren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß deren Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren größer ist als für einen oder mehrere von 5-HT₅ verschiedene 5-HT-Rezeptoren.

- 35 Erfindungsgemäße Bindungspartner binden daher bevorzugt an 5-HT₅-Rezeptoren. Unter Bindung versteht man jede molekulare Wechselwirkung zwischen dem Bindungspartner und dem Rezeptor, insbesondere unter physiologischen Bedingungen. Dies sind in der Regel klassische Wechselwirkungen, zu denen elektrostatische An-
40 ziehung, Wasserstoffbrücken-Bindung, hydrophobe Bindungen, van-der-Waals-Kräfte oder metallkomplexartige koordinative Bindungen gehören. Zusätzlich zu den vorstehend genannten, reversiblen molekularen Wechselwirkungen können auch irreversible Wechselwirkungen zwischen Bindungspartner und Rezeptor in Betracht kommen,
45 wie kovalente Bindungen.

4

Unter Selektivität versteht man die Eigenschaft eines Bindungspartners, vorzugsweise an 5-HT₅-Rezeptoren zu binden.

So besitzen Bindungspartner Bindungsaffinitäten für 5-HT₅-Rezeptoren, die größer sind als für einen oder mehrere von 5-HT₅ verschiedene 5-HT-Rezeptoren, also insbesondere den obengenannten 5-HT-Rezeptorklassen 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₆ und 5-HT₇ zuzuordnenden Rezeptoren. Ist die Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren eines Bindungspartners größer als die eines von 5-HT₅ verschiedenen 5-HT-Rezeptors, so spricht man von einer in Bezug auf den von 5-HT₅ verschiedenen 5-HT-Rezeptor selektiveren Bindung dieser Bindungspartner an 5-HT₅-Rezeptoren. Besondere Bindungspartner sind diejenigen, deren Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren größer ist als für 5-HT₁-Rezeptoren, insbesondere für 5-HT_{1D}- und/oder 5-HT_{1B}-Rezeptoren. Bindungspartner, deren Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren größer ist als für sämtliche von 5-HT₅ verschiedene 5-HT-Rezeptoren, stellen eine weitere besondere Klasse von Bindungspartnern dar.

Für die vorstehend geschilderte Selektivität ist maßgebend, daß sich die Bindungsaffinitäten für 5-HT₅-Rezeptoren einerseits und für einen oder mehrere von 5-HT₅ verschiedene 5-HT-Rezeptoren andererseits hinreichend unterscheiden. Bevorzugt sind Affinitätsunterschiede, wonach Bindungsaffinitäts-Verhältnisse von wenigstens 2, vorteilhafter von wenigstens 5, besonders vorteilhaft von wenigstens 10, vorzugsweise von wenigstens 20, besonders bevorzugt von wenigstens 50 und insbesondere von wenigstens 100 vorliegen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform hemmen erfindungsgemäße Bindungspartner die Bindung von Vergleichsbindungspartnern, wie 5-HT (5-Hydroxytryptamin) oder 5-CT (5-Carboxamidotryptamin), an 5-HT₅-Rezeptoren kompetitiv.

Unter kompetitiver Hemmung versteht man, daß erfindungsgemäße Bindungspartner mit einem Vergleichsbindungspartner, im vorliegenden Fall vorzugsweise 5-CT, um die Bindung an den Rezeptor konkurrieren, d.h. die Bindung des einen behindert die Bindung des anderen.

40

Zumindest für den Fall der reversiblen Bindung gilt der Grundsatz, daß die Verdrängung eines Bindungspartners durch einen anderen mit abnehmender Bindungsaffinität des einen bzw. zunehmender Bindungsaffinität des anderen im Hinblick auf den Rezeptor zunimmt. Zweckmäßigerweise besitzen daher erfindungsgemäße Bindungspartner eine hohe Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren. Eine derartige Bindungsaffinität gestattet einerseits eine wirk-

5

same Verdrängung natürlich vorkommender Bindungspartner für 5-HT₅-Rezeptoren, wie beispielsweise Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) selbst, wobei die erforderliche Konzentration an erfindungsgemäßen Bindungspartner zur Bindung einer bestimmten

- 5 Menge dieses Bindungspartners an 5-HT₅-Rezeptoren mit zunehmender Bindungsaffinität abnimmt. Im Hinblick auf die medizinische Anwendung werden daher Bindungspartner bevorzugt, deren Bindungsaffinität so groß ist, daß diese als Wirkstoff im Rahmen einer wirksamen medizinischen Behandlung in vertretbaren Mengen verabreicht werden können. Erfindungsgemäße Bindungspartner werden daher vorzugsweise in Tagesdosen von etwa 0,01 bis 100 mg/kg Körpergewicht und insbesondere von etwa 0,1 bis 15 mg/kg Körpergewicht bei parenteraler Gabe und etwa 1 bis 30 mg/kg Körpergewicht bei oraler Gabe verabreicht.

15

Eine Möglichkeit, die Bindungsaffinität auszudrücken, bieten die oben angesprochenen Kompetitionsexperimente, mit denen man diejenige Konzentration an erfindungsgemäßen Bindungspartner ermittelt, die einen anderen Vergleichsbindungspartner zu 50% von der Rezeptorbindungsstelle verdrängt (IC₅₀-Werte). So läßt sich auch die kompetitive Hemmung der Bindung von 5-HT an 5-HT₅-Rezeptoren dahingehend auswerten, daß erfindungsgemäß bevorzugte Bindungspartner halbmaximale Hemmkonstanten IC₅₀ von weniger als 10⁻⁷ M, vorzugsweise von weniger als 10⁻⁸ M und insbesondere von weniger als

- 20 10⁻⁹ M aufweisen.

Die Bindungsaffinität erfindungsgemäßer Bindungspartner kann auch über die Hemmkonstante K_i ausgedrückt werden, die man im allgemeinen ebenfalls mit Kompetitionsexperimenten bestimmt. Für die Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren weisen erfindungsgemäße Bindungspartner vorzugsweise K_i-Werte von weniger als 10⁻⁸ M, vorteilhafterweise von weniger als 10⁻⁹ M und insbesondere bevorzugt von weniger als 10⁻¹⁰ M auf.

- 35 Gemäß einer weiteren Ausführungsform binden erfindungsgemäße Bindungspartner in Bezug auf einen oder mehrere von 5-HT₅ verschiedene 5-HT-Rezeptoren selektiver an 5-HT₅-Rezeptoren mit den oben beschriebenen vorteilhaften Bindungsaffinitäten.

- 40 Gemäß einer weiteren Ausführungsform binden erfindungsgemäße Bindungspartner in Bezug auf alle von 5-HT₅ verschiedenen 5-HT-Rezeptoren selektiver an 5-HT₅-Rezeptoren mit den oben beschriebenen vorteilhaften Bindungsaffinitäten.

45

6

Besonders vorteilhaft sind Bindungspartner, die mit den vorstehend beschriebenen Affinitäten und Selektivitäten an 5-HT₅-Rezeptoren binden, die von Gliazellen und insbesondere von Astrocyten exprimiert werden.

5

Erfindungsgemäß ist die humane Rezeptorvariante bevorzugtes Target für die eingesetzten Bindungspartner.

Die Bindung erfindungsgemäßer Bindungspartner an 5-HT₅-Rezeptoren ist an eine Effektorfunktion gekoppelt. Bindungspartner können agonistisch oder antagonistisch sowie teilagonistisch und/oder teilantagonistisch wirken.

Als Agonisten werden erfindungsgemäß Verbindungen bezeichnet, die ganz oder teilweise die Aktivität von 5-HT an 5-HT₅-Rezeptoren nachahmen.

Als Antagonisten werden erfindungsgemäß Verbindungen bezeichnet, welche die agonistische Aktivität von 5-HT an 5-HT₅-Rezeptoren blockieren können.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden als Bindungspartner 5-HT₅-Agonisten bereitgestellt. Der Ausdruck "5-HT₅-Agonist" bezeichnet Bindungspartner, die eine teil- bis vollagonistische Wirkung auslösen. Ein Bindungspartner, der eine teilagonistische Wirkung am 5-HT₅-Rezeptor auslöst, besitzt erfindungsgemäß ausreichend agonistische Aktivität, um im Rahmen einer wirksamen medizinischen Behandlung in vertretbaren Mengen verabreicht werden zu können. Bevorzugt werden Bindungspartner mit wenigstens 50%-iger agonistischer Wirkung. Besonders bevorzugt sind diejenigen Bindungspartner mit wenigstens 80%-iger agonistischer Wirkung und insbesondere diejenigen mit im wesentlichen vollagonistischer Wirkung (E_{max}).

Im Rahmen dieser besonderen Ausführungsform werden insbesondere Bindungspartner zur Verfügung gestellt, deren Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren eine Stimulierung der GTP-Bindung an membrangebundene G-Proteine, eine Agonist-induzierte Veränderung intrazellulärer Calcium-Spiegel, eine Induktion der Phospholipase C-Aktivität und/oder eine Agonist-induzierte Veränderung der cAMP-Produktion bewirkt.

Zu dieser Ausführungsform gehören auch Bindungspartner, die in bekannten Tiermodellen für cerebrovaskuläre Erkrankungen, insbesondere für Migräne, wirksam sind, und/oder die bestimmte in vivo-Wirkungen in Gehirnbereichen induzieren, insbesondere genomische Antworten im Gehirn hervorrufen, beispielsweise die Expres-

sion von Transkriptionsfaktoren wie c-fos, c-jun, zif268 oder Homer-
mergen-Isoformen (Brakeman P.R. et al., Nature 386:284-288
(1997)).

- 5 Bevorzugt sind Bindungspartner, die auch in Bezug auf ihre Effektorfunktion im oben beschriebenen Sinn selektiver für 5-HT₅-Rezeptoren sind.

- Derartige Effektorfunktionen können mit Hilfe bekannter funktioneller Assays sowohl in vitro als auch in vivo qualitativ oder
10 quantitativ bewertet werden.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung erfindungsgemäßer Bindungspartner. Diese Verfahren können die Grundlage bilden für in
15 vitro-Screening-Verfahren, mit denen man aus einer Vielzahl verschiedener Verbindungen diejenigen auslesen kann, die im Hinblick auf eine künftige Anwendung am aussichtsreichsten zu sein scheinen. Beispielsweise können mittels kombinatorischer Chemie umfangreiche Stoffbanken angelegt werden, die Myriaden potentieller Wirkstoffe umfassen. Das Durchmustern kombinatorischer Substanzbibliotheken nach Stoffen mit gewünschter Aktivität ist automatisierbar. Screening-Roboter dienen der effizienten Auswertung der vorzugsweise auf Mikrotiterplatten angeordneten Einzelassays. So
20 betrifft die vorliegende Erfindung auch Screening-Verfahren, d.h. sowohl Primär- als auch Sekundärscreening-Verfahren, bei denen vorzugsweise wenigstens eines der nachfolgend beschriebenen Verfahren zur Anwendung kommt. Kommen mehrere Verfahren zur Anwendung, so kann das zeitlich versetzt oder gleichzeitig an ein und
25 derselben Probe oder an verschiedenen Proben einer zu untersuchenden Substanz geschehen.
30

- Eine besonders effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist der im Bereich des Wirkstoffscreenings bekannte
35 Scintillation Proximity Assay, kurz SPA genannt. Kits und Komponenten zur Durchführung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielsweise bei Amersham Pharmacia Biotech. Im Prinzip werden solubilisierete oder membrangebundene Rezeptoren auf Scintillationssubstanz enthaltenden, kleinen Fluoromikrosphären immobilisiert. Bindet beispielsweise ein Radioligand an die immobilisierten Rezeptoren, so wird die Scintillationssubstanz zur Lichtemission angeregt, da die räumliche Nähe zwischen Scintillationssubstanz und Radioligand gegeben ist.
40

- 45 Eine weitere besonders effektive Technologie zur Durchführung derartiger Verfahren ist die im Bereich des Wirkstoffscreenings bekannte FlashPlate^R-Technologie. Kits und Komponenten zur Durch-

8

führung dieses Assays können kommerziell bezogen werden, beispielsweise bei NEN^R Life Science Products. Dieses Prinzip basiert ebenfalls auf Mikrotiterplatten (96 r oder 384er), die mit Scintillationssubstanz beschichtet sind.

5

Ein erstes erfindungsgemäßes Verfahren dient zur Bestimmung der Affinität und/oder Selektivität von Bindungspartnern für 5-HT₅-Rezeptoren. Zu diesem Zweck bringt man den Bindungspartner mit 5-HT₅-Rezeptoren in Kontakt und bestimmt die Bindungsaffinität. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß man die kompetitive Hemmung der Bindung eines Vergleichsbindungspartner an 5-HT₅-Rezeptoren durch die zu untersuchende Substanz bewertet. Als Vergleichsbindungspartner eignen sich bekannte Liganden für 5-HT-Rezeptoren, wie 5-HT oder 5-CT. Diese werden zweckmäßigerweise so markiert, daß sich deren Bindung an 5-HT-Rezeptoren analytisch mit Standardmethoden verfolgen läßt. Bevorzugt sind radioaktive und optische Markierungen. Bei Bindungsstudien an 5-HT₅-Rezeptoren wird erfindungsgemäß 5-CT insbesondere in Form von [³H]-5-CT verwendet. Die Bindungsaffinitäten können als halbmaximale Hemmungskonstante IC₅₀ oder als Hemmkonstante K_i ausgedrückt werden. Dieses Verfahren dient vorzugsweise zum primären Screening. Die SPA-Technologie kommt bevorzugt zur Anwendung.

Die Bindung zu untersuchender Bindungspartner kann man auch an 5-HT-Rezeptoren direkt bestimmen. Die Bindungsaffinität ausdruckende Hemmkonstanten K_i können beispielsweise kalorimetrisch, d.h. durch Messung der freigesetzten Bindungsenergie, bestimmt werden.

Zur Bestimmung von Selektivitäten bestimmt man in gleicher Weise - gegebenenfalls unter Verwendung der für den jeweiligen Rezeptor spezifischen Liganden - die Bindungsaffinität der zu untersuchenden Bindungspartner für andere 5-HT-Rezeptoren und vergleicht die erhaltenen Werte.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren betrifft die Bestimmung der Aktivität von Bindungspartnern für 5-HT₅-Rezeptoren, d.h. die Bestimmung agonistischer, teilagonistischer, antagonistischer und/oder teilantagonistischer Wirkung. Zu diesem Zweck bringt man den Bindungspartner mit 5-HT₅-Rezeptoren in Kontakt und bewertet die durch die Bindung hervorgerufenen Effekte. Der Beurteilung einer agonistischen Aktivität können all diejenigen Effekte zugrundegelegt werden, die durch die Bindung von 5-HT an 5-HT₅-Rezeptoren hervorgerufen werden. Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, die Auswirkungen auf die Bindung von GTP an G-Proteine, auf intrazelluläre Calcium-Spiegel, auf die Phospholipase C-Aktivität und/oder auf die cAMP-Produktion zu bewerten. Diese Verfahren

dienen vorzugsweise zum sekundären Screening. Auch hier kommt die SPA-Technologie vorteilhaft zur Anwendung.

Die GTP-Bindung an G-Proteine kann untersucht werden, indem man
5 ein nicht hydrolysierbares Analogon von GTP verwendet, beispielsweise [³⁵S]GTPγS, dessen Bindung radiologisch untersucht werden kann. Diese Untersuchung wird vorzugsweise an 5-HT₅-Rezeptor aufweisenden Membranen durchgeführt.

10 Zur Messung intrazellulärer Calcium-Spiegel kann man geeignete Calcium-Sonden, in der Regel Calcium-Chelatoren, beispielsweise fluoreszierende Verbindungen, wie Fura-2-acetylmethylester, einsetzen. Diese Untersuchung wird vorzugsweise an 5-HT₅-Rezeptor aufweisenden Einzelzellen durchgeführt.

15 Die Phospholipase C-Aktivität läßt sich anhand der von ihr katalysierten Reaktionen bestimmen, beispielsweise dem Einbau von Myo-Inositol, das zu Nachweiszwecken vorzugsweise als [³H]-Myo-Inositol radioaktiv markiert ist, oder die Umsetzung von PPIP₂ zu IP₃,
20 wobei auch das PPIP₂ vorzugsweise als [³²P]PIP₂ radioaktiv markiert ist. Diese Untersuchungen werden vorzugsweise an 5-HT₅-Rezeptor aufweisenden Einzelzellen durchgeführt.

Die cAMP-Produktion kann mit Hilfe des cAMP-Bindungsproteins bestimmt werden. Diese Untersuchung wird vorzugsweise an 5-HT₅-Rezeptor aufweisenden Einzelzellen durchgeführt.

Gegebenfalls bestimmt man auch die Effektorfunktion, d.h. die Aktivität von erfindungsgemäßen Bindungspartnern für andere 5-HT-
30 Rezeptoren. Dies geschieht zweckmäßigerweise unter Berücksichtigung der für 5-HT₅ und andere 5-HT-Rezeptoren ermittelten Bindungsaffinitäten, also insbesondere unter Berücksichtigung der Selektivität.

35 Die vorstehend genannten Verfahren sind dem Fachmann im Prinzip bekannt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden Bindungspartner einem primären Screening unterzogen, indem man ihre Bindungsaffi-
40 nität zu 5-HT₅-Rezeptoren mit dem oben beschriebenen [³H]-5-CT-Kompetitionsexperiment bestimmt. Diejenigen Bindungspartner, die eine Hemmkonstante IC₅₀ im Bereich von 10⁻⁶ M oder weniger aufweisen, werden dann einem sekundären Screening unterzogen, indem man ihre Effektorfunktion insbesondere im Hinblick auf die GTP-Bin-
45 dung und die intrazellulären Calcium-Spiegel in der oben beschriebenen Weise bewertet. Schließlich werden die so ausgewählten Bindungspartner zur Selektivitätsbestimmung einem Gegen-Scre-

10

ning unterzogen, indem man ihre Bindungsaffinität zu weiteren 5-HT-Rezeptoren im wesentlichen in der vorstehend beschriebenen Art und Weise - gegebenenfalls unter Verwendung der für den jeweiligen Rezeptor spezifischen Liganden - bestimmt. Beispielsweise kann man [^3H]-8-Hydroxy-di-propylaminotetralin [^3H]-8-DPAT für Bindungsstudien an 5-HT_{1A}-Rezeptoren verwenden, während 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren mit [^3H]-5-CT-Kompetitionsexperimenten untersucht werden können.

- 10 5-HT₅-Rezeptoren werden vorzugsweise in Form zellulärer Systeme zur Verfügung gestellt, d.h. in Form von Membranen, Zellen, Zellverbänden, Geweben oder Organen, die 5-HT₅-Rezeptoren tragen. Derartige zelluläre Systeme können 5-HT₅-Rezeptoren von Natur aus exprimieren, sie können aber auch durch geeignete genetische Manipulation, z.B. durch Transfektion, zur 5-HT₅-Expression veranlaßt sein. Humane Gliom-Zelllinien werden als natürliche, 5-HT₅-Rezeptoren aufweisende zelluläre Systeme bevorzugt. Von den h5-HT₅-transfizierten heterologen Zelllinien werden diejenigen bevorzugt, die das h5-HT₅-Gen stabil exprimieren. Zu nennen sind
- 20 beispielsweise h5-HT₅-transfizierte CHO-Zellen, h5-HT₅-transfizierte humane Nierenzellen, insbesondere h5-HT₅-transfizierte HEK293-Zellen, oder h5HT₅-transfizierte C-6-Gliomzellen.

Zur Bestimmung von Selektivität, Affinität und Aktivität erfindungsgemäßer Bindungspartner können auch Gehirngewebeschnitte und native Membranen aus Gehirnteilen verwendet werden. Werden radioaktive Marker eingesetzt, so erfolgt die Auswertung von Gewebeschnitten vorzugsweise autoradiographisch.

- 30 Die erfindungsgemäßen Bindungspartner werden gewöhnlich in Form von pharmazeutischen Zusammensetzungen verabreicht, die einen pharmazeutisch-verträglichen Exzipienten mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Bindungspartner und gegebenenfalls weiteren Wirkstoffen umfassen. Diese Zusammensetzungen können beispielsweise
- 35 auf oralem, rektalem, transdermale, subkutanem, intravenösem, intramuskulärem oder intranasalem Weg verabreicht werden.

Beispiele geeigneter pharmazeutischer Formulierungen sind feste Arzneiformen, wie Pulver, Puder, Granulate, Tabletten, Pastillen,

40 Sachets, Cachets, Dragees, Kapseln wie Hart- und Weichgelatine-kapseln, Suppositorien oder vaginale Arzneiformen, halbfeste Arzneiformen, wie Salben, Cremes, Hydrogele, Pasten oder Pflaster, sowie flüssige Arzneiformen, wie Lösungen, Emulsionen, insbesondere Öl-in-Wasser-Emulsionen, Suspensionen, beispielsweise Lotionen,

45 Injektions- und Infusionszubereitungen, Augen- und Ohrentropfen. Auch implantierte Abgabevorrichtungen können zur Verabreichung erfindungsgemäßer Bindungspartner verwendet werden. Fer-

ner können auch Liposomen, Mikroshären oder Polymermatrizes zur Anwendung kommen.

- Bei der Herstellung der Zusammensetzungen werden erfindungsgemäße
- 5 Bindungspartner gewöhnlich mit einem Exzipienten vermischt oder verdünnt. Exzipienten können feste, halbfeste oder flüssige Materialien sein, die als Vehikel, Träger oder Medium für den Wirkstoff dienen.
- 10 Zu geeigneten Exzipienten gehören beispielsweise Lactose, Dextrose, Succrose, Sorbitol, Manitol, Stärken, Akaziengummi, Calciumphosphat, Alginate, Traganth, Gelantine, Calciumsilikat, mikrokristalline Cellulose, Polyvinylpyrrolidon, Cellulose, Wasser, Sirup und Methylcellulose. Ferner können die Formulierungen pharmazeutisch akzeptable Träger oder übliche Hilfsstoffe, wie Gleitmittel, beispielsweise Talg, Magnesiumstearat und Mineralöl; Netzmittel; emulgierende und suspendierende Mittel; konservierende Mittel, wie Methyl- und Propylhydroxybenzoate; Antioxidantien; Antireizstoffe; Chelatbildner; Dragierhilfsmittel; Emulsionsstabilisatoren Filmbildner; Gelbildner; Geruchsmaskierungsmittel; Geschmackskorrigentien; Harze; Hydrokolloide; Lösemittel; Lösungsvermittler; Neutralisierungsmittel; Permeationsbeschleuniger; Pigmente; quaternäre Ammoniumverbindungen; Rückfettungs- und Überfettungsmittel; Salben-, Creme- oder Öl-Grundstoffe; Silikon-
- 20 Derivate; Spreithilfsmittel; Stabilisatoren; Sterilanzien; Suppositoriengrundlagen; Tabletten-Hilfsstoffe, wie Bindemittel, Füllstoffe, Gleitmittel, Sprengmittel oder Überzüge; Treibmittel; Trocknungsmittel; Trübungsmittel; Verdickungsmittel; Wachse; Weichmacher; Weißöle umfassen. Eine diesbezügliche Ausgestaltung
- 30 beruht auf fachmännischem Wissen, wie beispielsweise in Fiedler, H.P., Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, 4. Auflage, Aulendorf: ECV-Editio-Kantor-Verlag, 1996, dargestellt ist.
- 35 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung eines Bindungspartner für 5HT-5-Rezeptoren und insbesondere der vorstehend genannten besonderen und bevorzugten Ausführungsformen erfindungsgemäßer Bindungspartner zur Behandlung migräneartiger cerebrovasculärer Erkrankungen, vor allem zur Behandlung von Migräne und anderen vaskulär bedingten Kopfschmerzen, insbesondere anfallartigen Kopfschmerzen vom Migränetyp. Hierzu gehören die als einfache und als klassische Migräne bezeichneten Erkrankungen ohne bzw. mit begleitenden neurologischen Funktionsstörungen, echte und atypische Migräne, und auch speziellere Erkrankungen
- 40 dieses Typs, beispielsweise Migraine accompagnée, sogenannte Migräneäquivalente, Digestivmigräne, Migraine ophtalmique, ophtalmophlegische Migräne, Migraine rouge, auch als Cluster-Kopf-
- 45

12

schmerz (Horton-Syndrom) bezeichnet, Zervikalmigräne. Unter Behandlung wird sowohl eine prophylaktische Therapie, insbesondere die Vorbeugung gegen wiederkehrende Attacks, beispielsweise als Intervallbehandlung, als auch die Behandlung bei akuten Symptomen, insbesondere während der Kopfschmerzphasen, verstanden. Eine erfolgreiche Behandlung führt zu einer Minderung der Intensität der Symptome, insbesondere des Kopfschmerzes, neurologischer Funktionsstörungen, z.B. visueller, sensorischer, motorischer Störungen und Sprachstörungen, Übelkeit und Brechreiz, und/oder der Anfallhäufigkeit. Eine akute Behandlung von Migräne mit Bindungspartnern ist bevorzugt. Gegenstand der Erfindung ist insbesondere auch die Verwendung der genannten Bindungspartner für die Behandlung solcher Formen oben aufgeführter Erkrankungen, an deren Entstehung und/oder Verlauf 5-HT₅-Rezeptoren beteiligt sind, d.h. Erkrankungen, die durch eine 5-HT₅-Rezeptoraktivität moduliert werden.

Zu Bindungspartnern für 5-HT₅-Rezeptoren gehören im Hinblick auf die erfindungsgemäße Verwendung auch insbesondere diejenigen, deren Bindungsaffinität zu 5-HT₅-Rezeptoren verglichen mit der Affinität zu 5-HT₁-Rezeptoren, insbesondere 5-HT_{1B} und/oder 5-HT_{1D}, so hoch ist, daß sie für die erfindungsgemäße Verwendung in vorteilhafter Weise geeignet sind. Dies setzt nicht notwendigerweise eine vergleichsweise selektivere Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren voraus, wenngleich selektive Bindungspartner für 5-HT₅-Rezeptoren eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert, ohne darauf beschränkt zu sein.

Referenzbeispiel 1

h5-HT₅-Rezeptor exprimierende HEK293-Zellen

Das für den humanen 5-HT₅-Rezeptor kodierende Gen wurde in an sich bekannter Weise über 3'-5'-RT-PCR (RACE-System, Boehringer Mannheim) aus menschlichen Geweben isoliert. Die Gensequenz wurde dann in ein das Neomycinresistenz-Gen tragendes Plasmid inseriert (pcDNA3; Invitrogen, Deutschland) und in E. coli den Herstellerhinweisen entsprechend amplifiziert. Eine Präparation des resultierenden Plasmids wurde mit Lipofectamin^R (Gibco Life-Sciences, Deutschland) vermischt, und HEK293-Zellen wurden in Petrischalen (2,5 cm) mit einer dünnen Schicht dieses Transfektionsgemisches inkubiert. Danach wurde das Transfektionsgemisch durch Neomycin-haltiges Kulturmedium ersetzt. Überlebende Zellen wurden weiter in DMEM-F12-Medium kultiviert, das mit 10% fötalem Kälber-

serum, 2 mM Glutamin und Antibiotika (90 mg Streptomycin, 90 mg Penicillin) ergänzt war. Die Zellen wurden bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C bis zur Konfluenz aufgezogen.

5 Referenzbeispiel 2

Zellmembran-Präparation

Die hier verwendete Methode lehnt sich im wesentlichen an bekannte Methoden zur Präparation von Zellmembranen aus Zellen an (Findlay J.B.C. und Evans W.H. Biological Membranes, Practical Approach (1987)). Die gemäß Referenzbeispiel 1 kultivierte Zellen wurden vorsichtig von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgeschabt und 10 min bei 180xg in DMEM-F12-Medium zentrifugiert. Die gewonnenen Zellpellets wurden in 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0,1 mM PMSF und 3 mM Benzamidin enthaltendem 5 mM Tris-HCl-Puffer (pH: 7,6; Puffer A) resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in einem Ultraturrax^R (15000 UPM) homogenisiert (6x3s) und 1 min bei 1000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer A resuspendiert und, wie vorstehend beschrieben, homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände aus beiden Schritten wurden gesammelt und 20 min bei 40000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer A resuspendiert und homogenisiert (1x15s). Die Membransuspension wurde 20 min bei 40000xg und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 10% Glycerin und 1% Rinderserumalbumin enthaltendem Puffer A resuspendiert. Es wurden Aliquots eingefroren und bei -80°C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Referenzbeispiel 3

30

Kinetik der Sättigungsbindung von [³H]-5-CT

Die Methodik ist im wesentlichen bekannt (Ress S. et al., FEBS Letters 335:242-246 (1994)). Gemäß Referenzbeispiel 2 gewonnene Membranen (200 µl) wurden bei einem Gesamtvolumen von 600 µl in 1 mM EDTA enthaltendem 100 mM Tris-HCl (pH: 7,7; Puffer B) mit ansteigenden Konzentrationen an [³H]-5-CT (96 Ci/mmol) inkubiert, wobei zur Bestimmung der spezifischen Bindung 10 µM Methiothepin zugesetzt wurde, während zur Bestimmung der Gesamtbindung Methiothepin nicht zugesetzt wurde. Es wurde 90 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Proben filtriert, wobei man ein Skatron^R-Filtrationssystem und in 0,3% Polyethylenimid eingebettete GF/B-Filter verwendete. Die Filter wurden mit 9 ml Puffer B bei 4°C gewaschen. Die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität wurde mittels Flüssigscintillationszählung gemessen, wobei man 5 ml Ultima-Gold (Packard) verwendete.

Referenzbeispiel 4

[³H]-5-CT-Bindungskompetition

- 5 Die Experimente zur Bindungskompetition erfolgten im wesentlichen in Anlehnung an bekannte Untersuchungen (Rees et al., 1994). Gemäß Beispiel 2 gewonnene Membranen (200 µl) wurden in einem Gesamtvolumen von 600 µl in Puffer B mit ansteigenden Konzentrationen ausgewählter Verbindungen in Gegenwart von 2 nM [³H]-5-CT inkubi-
10 kubierte. Nach einer Inkubationszeit von 75 min bei 30°C wurden die Proben mit Puffer B bei 4°C über in 0,3% Polyethylenimid eingebetteten GF/B-Filtern filtriert. Die Filter wurden mit 9 ml Puffer B gewaschen. Die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität wurde wie in Referenzbeispiel 3 bestimmt. Die Gesamtbindung wurde
15 definiert als diejenige Bindung des Radioliganden, die ohne Zusatz weiterer Verbindungen beobachtet wurde. Die nicht-spezifische Bindung wurde definiert als diejenige Bindung von [³H]-5-CT, die in Gegenwart von 10 µM Methiothepin beobachtet wurde. Es können auch ähnliche Systeme verwendet werden, die durch Verwendung
20 von Mikrotiterplatten einen hohen Probendurchsatz und ein Sekundärscreening gestatten.

- Die Sättigungsparameter der [³H]-5-CT-Bindung wurden sowohl durch nicht-lineare Regressionsanalyse als auch aus linearen Auftragun-
25 gen bei Verwendung der SigmaPlot-Software (Jandel Scientific, Germany) bestimmt. Es wurden Kompetitionskurven aufgestellt, in denen die radioaktive Bindung als prozentualer Anteil der Gesamtbindung ausgedrückt ist. Halbmaximale Hemmkonstanten IC₅₀ und Hill-Koeffizienten (n_H) wurden mittels nicht-linearer Regres-
30 sionsanalyse ermittelt.

Referenzbeispiel 5

- Bestimmung der Agonist-induzierten Stimulierung der [³⁵S]GTPγS-
35 Bindung

- [³⁵S]GTPγS-Bindungsassays sind bekannt. Der vorliegende Assay wurde in Anlehnung an die zuvor beschriebene Methode von Hilf, G. und Jakobs, K.H. (Eur. J. Mol. Pharmacol. 225:245-252 (1992))
40 durchgeführt. Es wurden Wirkstoff-induzierte Veränderungen der [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membranen aus stabil mit dem h5HT5-Rezeptor-
gen transfizierten HEK293-Zellen gemessen (siehe Referenzbeispiele 1 und 2). Die Zellmembranen (12 µg) wurden mit 6,75 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10 µM GDP und [³⁵S]GTPγS
45 enthaltendem 50 mM Triethanolamin-HCl-Puffer (pH: 7.5) inkubiert. Im Anschluß an eine 60-minütige Inkubation bei 30°C mit oder ohne Zusatz der zu testenden Wirkstoffe wurde das Testgemisch (100 µl)

rasch über GF-B-Filtern bei Verwendung einer Skatron^R-Filtrationsvorrichtung filtriert. Die Filter wurden rasch mit 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂ enthaltendem 50 mM Tris-HCl-Puffer (9 ml; pH: 7,5; 4°C) gewaschen. Die auf den Filtern zurückgehaltene Radioaktivität wurde mittels Scintillationsspektrometrie bestimmt, wobei man Ultima Gold-Scintillationsflüssigkeit verwendete. Ebenfalls verwendet werden können ähnliche Systeme, die durch Verwendung von Mikrotiterplatten einen hohen Durchsatz und ein Sekundärscreening gestatten.

10

Die Wirkstoffaktivitäten wurden als prozentualer Anteil der in Abwesenheit des Wirkstoffes gemessenen Grundbindung ausgedrückt. Die Anpassung der Kurven erfolgte mit einer Software zur nicht-linearen Regressionsanalyse (SigmaPlot, Jandel Scientific,

Deutschland) gemäß der allgemeinen Gleichung $E = (L \cdot E_{\max}) / (L + EC_{50})$, worin E die Wirkung, L die Ligandkonzentration, E_{\max} die Maximalwirkung und EC_{50} diejenige Konzentration, die 50% der Maximalwirkung induziert, bedeutet.

20 Referenzbeispiel 6

Bestimmung der Agonist-induzierten Veränderung intrazellulärer Calciumspiegel

Die Methode ist bekannt (Kao J.P.Y. *Methods in Cell Biology* 40:155-181 (1994)). Wie in Referenzbeispiel 1 beschrieben, wurden h5HT₅-Rezeptor exprimierende HEK293-Zellen in Kulturgefäßen aufgezogen. Die Zellen wurden vorsichtig abgeschabt, bevor sie konfluent waren. Die Zellen wurden mit Fura-2 markiert, indem man mit Fura-2-acetylmethylester (Sigma) bei Raumtemperatur inkubierte. Die Zellen wurden bei 180xg 10 min zentrifugiert und in DMEM-F12-Medium ohne Serum resuspendiert und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit 45 min inkubiert.

Intrazelluläre Calciumspiegel wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt, das mit einem geeigneten Filteraustauschsystem ausgestattet war (Olympus/Hamamatsu). Es wurde das Fluoreszenzverhältnis (340 nm / 380 nm) mit der Argus^R-Software bestimmt. Die intrazellulären Calciumspiegel wurden über kurze Zeit in einzelnen Zellen ohne den Zusatz von Wirkstoffen und dann 30 min nach Zugabe des zu testenden Wirkstoffs beobachtet. Ebenfalls verwendet werden können ähnliche Systeme, die durch die Verwendung von Mikrotiterplatten einen hohen Durchsatz und ein Sekundärscreening gestatten.

45

5 Referenzbeispiel 7

Bestimmung der Agonist-induzierten Phospholipase C-Aktivität

Die Methode ist im wesentlichen bekannt (Garcia-Ladona F.J. et al., Neuroreport 4:691-694 (1993)). Die Zellen wurden 24 h mit 0,125 μM [^3H]Myo-Inositol inkubiert. Nicht eingebautes [^3H]Myo-Inositol wurde aus dem Medium entfernt und durch 10 mM LiCl enthaltendem Krebs-Henseleit-Puffer ersetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der zu testende Wirkstoff zugesetzt. Nach 45 min wurde die Reaktion gestoppt, indem man das Stimulationsmedium durch destilliertes Wasser ersetzte. Verwendet man Gewebeproben, geht man in ähnlicher Weise vor (Garcia-Ladona et al., 1993). Die Zellen wurden eingefroren und bei -80°C gelagert. Es wurde die Produktion von [^3H]Inositolmonophosphat mittels bekannter chromatographischer Methoden bestimmt. Eine ähnliche Methode kann mit Gewebe-Miniprismen zur Anwendung kommen. Die Bestimmung der Phospholipase C-Stimulierung wurde ebenfalls in ähnlicher Weise durchgeführt, indem man Membranfraktionen, wie in Referenzbeispiel 2 beschrieben, präparierte und mit [^{32}P]PIP₂ und Wirkstoffen inkubiert. In diesem Fall wurde die Produktion von IP₃ bestimmt. Es wurden auch bekannte Verfahren optimiert, um auf Mikrotiterplatten basierende Systeme zu verwenden. Kommerziell erhältliche Materialien gestatten die Ausdehnung auf Analysen mit hohem Durchsatz und die Durchführung eines Sekundärscreenings.

30

Referenzbeispiel 8

Bestimmung der Agonist-induzierten Veränderung der cAMP-Produktion

35

Die verwendete Methode ist im wesentlichen bekannt (Strada S.S. et al., Methods in Neurotransmission receptor analysis: 89-110 (1990)). Zellen wurden 10 min in Kulturmedium ohne Serum und Antibiotika inkubiert. Es wurde 15 min auf 95°C erwärmt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellproben wurden eingefroren und bei -80°C gelagert. cAMP-Spiegel wurden mit kommerziell erhältlichen Kits bestimmt, die das cAMP-Bindungsprotein verwenden. Es wurden auch bekannte Verfahren optimiert, um auf Mikrotiterplatten basierende Systeme zu verwenden. Kommerziell erhältliche Materialien gestatten die Ausdehnung auf Analysen mit hohem Durchsatz und die Durchführung eines Sekundärscreenings.

45

Referenzbeispiel 9

5

Gewebepräparation

90 min nach Verabreichung des Wirkstoffs (oral, intraperitoneal, intravenös oder intracerebroventriculär) wurden die Versuchstiere
10 enthauptet. Das gesamte Gehirn wurde rasch aus dem Schädel entfernt, auf Trockeneis gefroren und bei -80°C gelagert. Rattenhirnschnitte ($15\text{ }\mu\text{m}$) wurden bei -20°C in einem Cryostat erhalten, auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgebracht und bei -30°C bis zum Gebrauch gelagert.

15

Beispiel 1

Gemäß Referenzbeispiel 3 wurde die Bindungsaffinität von $[^3\text{H}]\text{-5-CT}$ an 5-HT₅-Rezeptoren bestimmt. Figur 1 zeigt eine Auftragung von
20 gebundenem $[^3\text{H}]\text{-5-CT}$ in Abhängigkeit der $[^3\text{H}]\text{-5-CT}$ -Konzentration. Es wurde eine Dissoziationskonstante von $K_d = 0.570\text{ nM}$ bestimmt. Die Rezeptorbindungsichte (B) variierte je nach klonaler Zelllinie in einem Bereich von 900-28000 fmol/mg Protein.

25 Beispiel 2

Gemäß Referenzbeispiel 4 wurden die Bindungsaffinitäten serotonin-
nerger Verbindungen anhand der $[^3\text{H}]\text{-5-CT}$ -Bindungskompetition bestimmt. Folgende IC_{50} -Werte wurden erhalten:

30

Verbindung	IC_{50} [M]
35 R(+)-8-OH-DPAT ¹⁾	$6,75 \cdot 10^{-7}$
Methiothepin	$6,2 \cdot 10^{-10}$
Dihydroergotamin	$1,79 \cdot 10^{-8}$
Sumatriptan	$7,6 \cdot 10^{-6}$
40 Methysergid	$1,48 \cdot 10^{-7}$
R(+)-Lisurid	$8,2 \cdot 10^{-9}$
Buspiron	inaktiv

45

18

In einer weiteren Testreihe wurden auch die Hemmkonstanten K_i folgender Verbindungen bestimmt ($K_i = IC_{50}/(1+C/K_d)$), wobei C die Konzentration an [3H]-5-CT ist und K_d gemäß Beispiel 1 bestimmt wurde):

5	Verbindung	K_i [M]
	R(+)-8-OH-DPAT	$1,25 \cdot 10^{-7}$
	5-CT	$1,44 \cdot 10^{-9}$
	Dihydroergotamin	$4,05 \cdot 10^{-9}$
10	Sumatriptan	$8,12 \cdot 10^{-7}$
	Methysergid	$1,54 \cdot 10^{-8}$

Beispiel 3

15 Gemäß Referenzbeispiel 5 wurde die Wirkstoff-induzierte Bindung von GTP an G-Proteine untersucht. Die Kopplung von 5-HT₅-Rezeptoren an G-Proteine in HEK293-Zellen war evident. Die typischen serotoninergen Agonisten 5-HT und 5-CT induzierten einen Anstieg
20 der [^{35}S]GTP γ S-Bindung an die Zellmembranen von über 40 % über dem Grundwert (siehe Figur 2). Der 5-HT₅-Rezeptor benötigt GDP für die durch Agonisten vermittelte Kopplung an G-Proteine (siehe Figur 3A). Der 5-HT-Effekt war dosisabhängig (siehe Figur 4) mit einer EC_{50} von 2,6 μM .

25

Beispiel 4

Gemäß Referenzbeispiel 6 wurde die Wirkstoff-induzierte Auswirkung auf intrazelluläre Calcium-Spiegel untersucht. Die Stimulierung der 5-HT₅-Rezeptoren mit R(+)-Lisurid (1 μM) in HEK293-Zellen
30 induzierte einen Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} (siehe Figur 5).

35

40

45

Patentansprüche

1. Selektiver Bindungspartner für 5-HT₅-Rezeptoren, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren größer ist als für einen oder mehrere von 5-HT₅ verschiedene 5-HT-Rezeptoren.
5
2. Bindungspartner nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Bindungsaffinität für 5-HT₅-Rezeptoren größer ist als für 5-HT_{1D}- und/oder 5-HT_{1B}-Rezeptoren.
10
3. Bindungspartner nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß er die Bindung von 5-CT an 5-HT₅-Rezeptoren kompetitiv hemmt.
15
4. Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die K_i -Werte für dessen Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren weniger als 10^{-8} M, vorzugsweise weniger als 10^{-9} M und insbesondere weniger als 10^{-10} M betragen.
20
5. Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren die GTP-Bindung an G-Proteine stimuliert.
25
6. Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren eine Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels bewirkt.
- 30 7. Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren eine Induktion der Phospholipase C-Aktivität bewirkt.
8. Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß dessen Bindung an 5-HT₅-Rezeptoren eine Induktion der cAMP-Produktion bewirkt.
35
9. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend wenigstens einen Bindungspartner nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und einen pharmazeutisch verträglichen Exzipienten sowie gegebenenfalls weitere Wirkstoffe.
40
10. Verwendung eines Bindungspartners für 5-HT₅-Rezeptoren zur Behandlung cerebrovasculärer Erkrankungen.
45

1006/98/AP; 11.01.99; 58/cb

2

11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von Migräne, insbesondere zur akuten Behandlung von Migräne.
12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11 eines Bindungspartners
5 nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
13. Verfahren zur Bestimmung der Affinität von Bindungspartnern für 5-HT₅-Rezeptoren, wobei man den Bindungspartner mit 5-HT₅-Rezeptoren aufweisenden zellulären Systemen in Kontakt
10 bringt und die Bindungsaffinität bestimmt.
14. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Bindungspartnern für 5-HT₅-Rezeptoren, wobei man den Bindungspartner mit 5-HT₅-Rezeptoren aufweisenden zellulären Systemen in Kontakt
15 bringt und wenigstens eine Bindungspartner-induzierte agonistische Wirkung bestimmt.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Bindung von GTP an G-Proteine, intrazelluläre Calcium-Spiegel, die Phospholipase C-Aktivität und/oder die cAMP-Produktion bestimmt werden.
20
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß man humane Gliom-Zelllinien oder h5-HT₅-transfizierte heterologe Zelllinien verwendet.
25
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man h5-HT₅-transfizierte CHO-Zellen, h5-HT₅-transfizierte humane Nierenzellen, oder h5HT₅-transfizierte C-6-Gliomzellen verwendet.
30
18. In vitro-Screening-Verfahren zur Identifizierung eines 5-HT₅-Rezeptor-Bindungspartners, wobei wenigstens ein Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 17 zur Anwendung kommt.
35
- 40
- 45

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft selektive Bindungspartner für 5-HT₅-Rezeptoren, Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung solcher Bindungspartner insbesondere in Form von Screening-Verfahren, sowie pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Bindungspartner enthalten, und deren Verwendung zur Behandlung cerebrovaskulärer Erkrankungen wie Migräne.

10

15

20

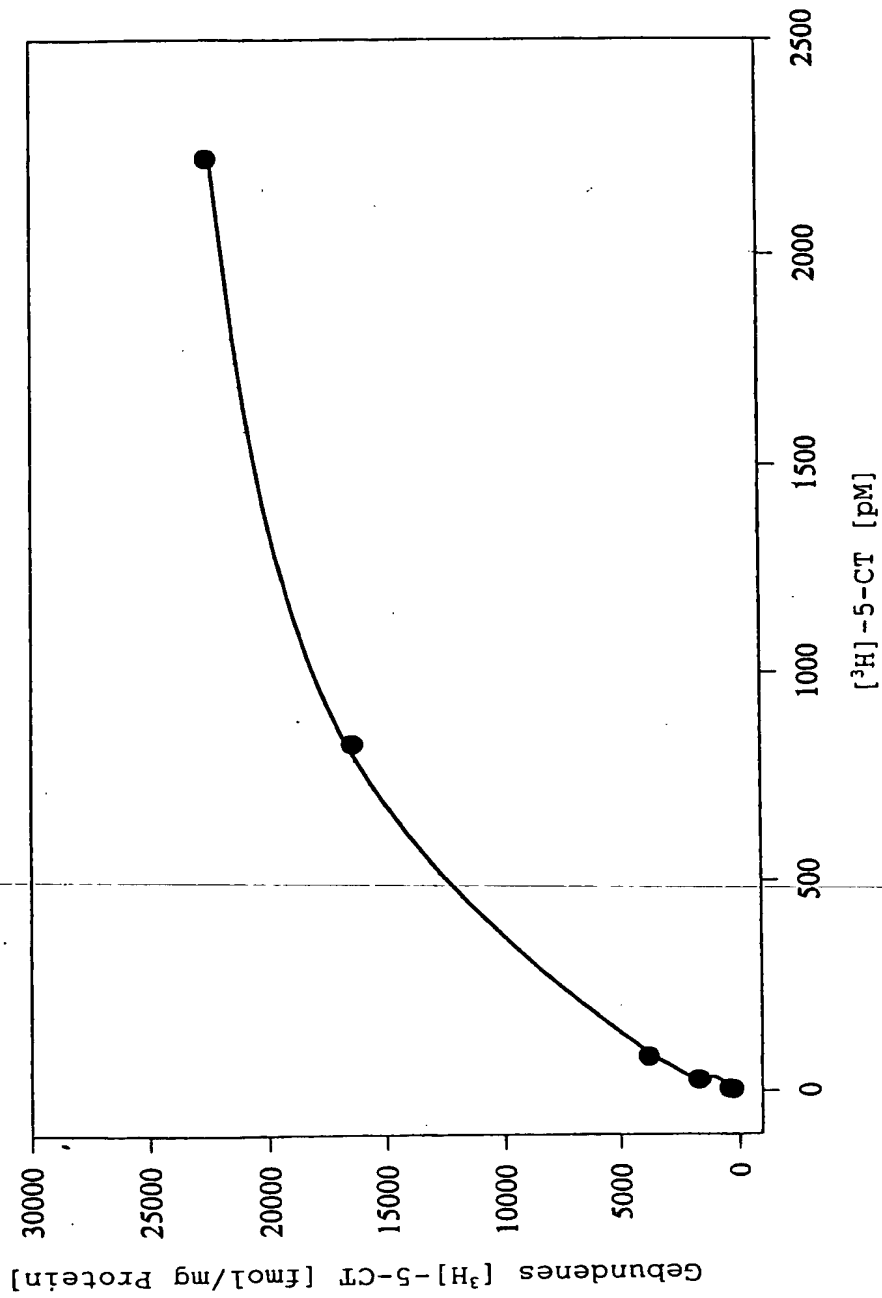
25

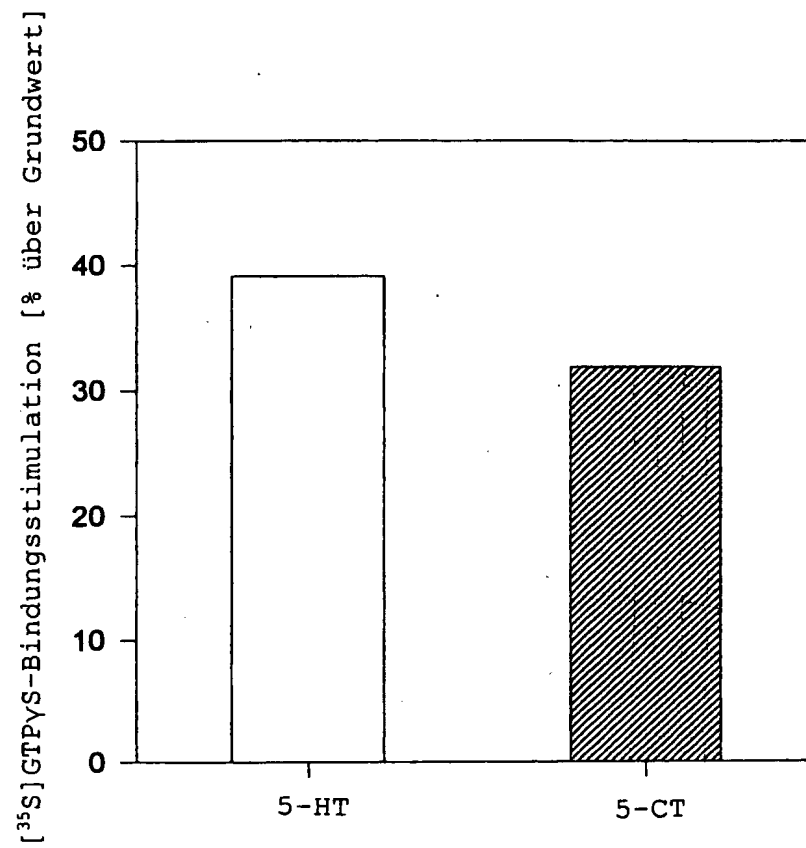
30

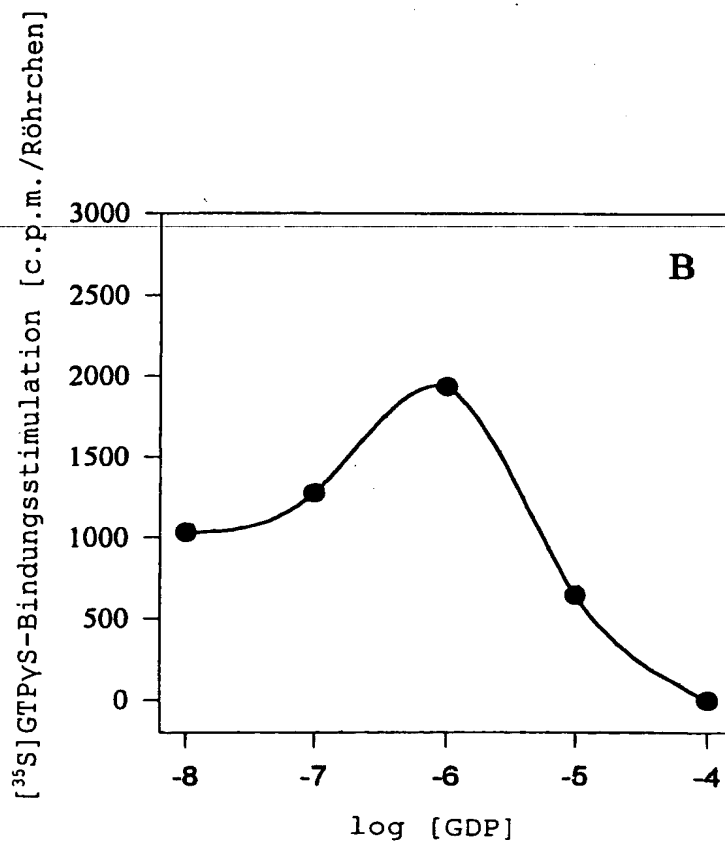
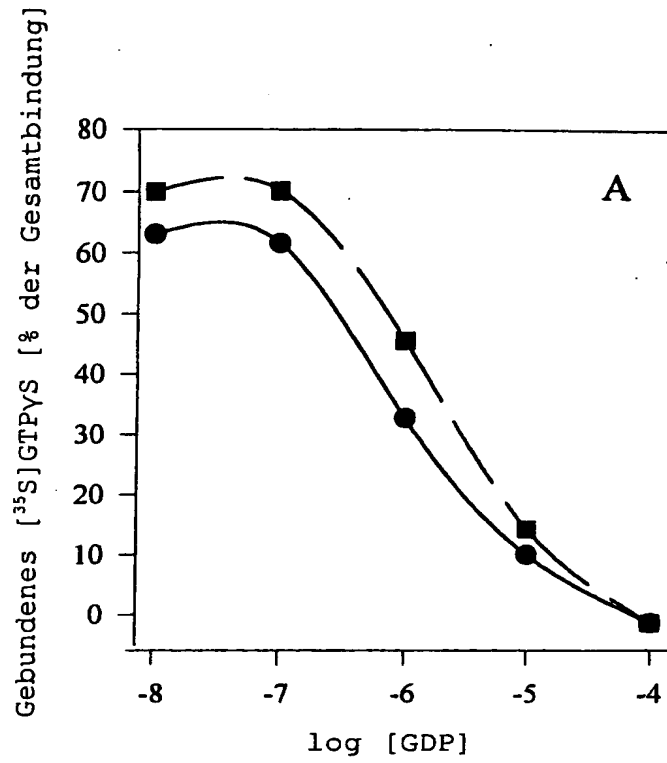
35

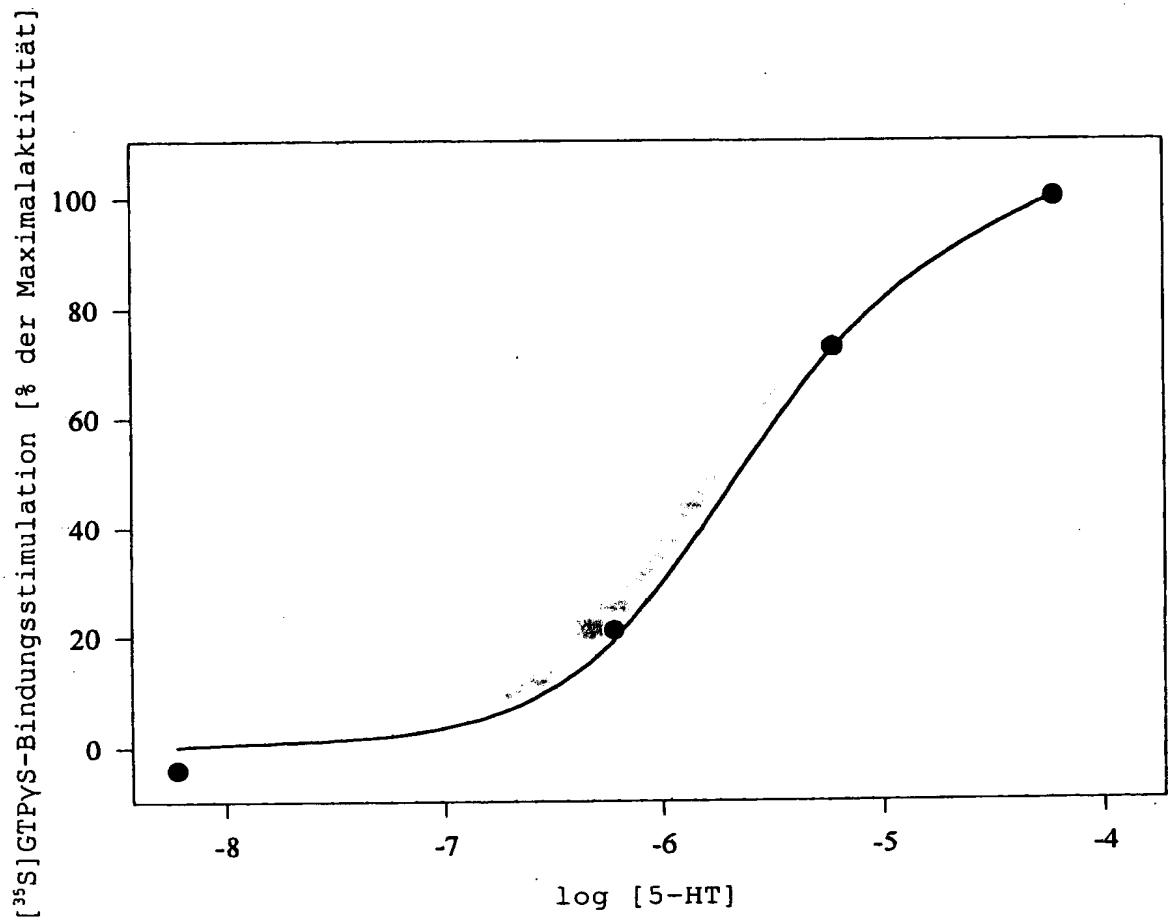
40

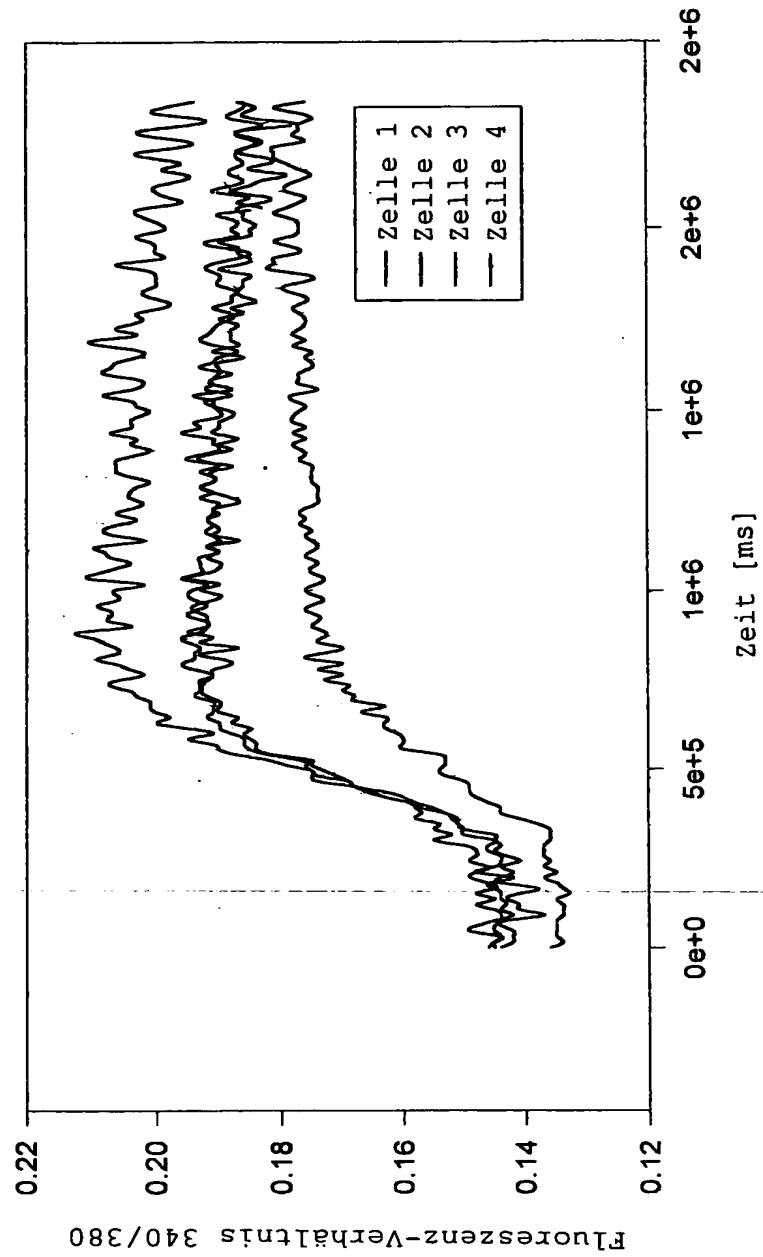
45

Figur 1

Figur 2

Figur 3

Figur 4

Figur 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)